

## 論文内容の要旨

応用生命化学 専攻

平成 24 年度博士課程 進学

氏 名 佐藤 輝

指導教員名 篠崎 和子

## 論文題目

ストレス特異的な転写複合体形成に基づく

シロイヌナズナの環境ストレス誘導性転写因子 DREB2A の

制御機構解析およびその応用的な利用方法の検討

### 第1章 序論

現在、観測されている温暖化を含めた地球規模での気候変動や異常気象は、今後植物の植生に大きな影響を与えると考えられており、作物の生産に対しては、多くの場合において負の影響を生じると予測されている。また、近年農作物をバイオエタノールなどのエネルギー資源として利用する試みも広がりを見せており、安定した食糧生産に対する種々の課題が存在する。このような問題に対する解決策の一つとして、環境の変動に対する耐性を向上させた作物の作出が考えられる。環境耐性を作物に付与することにより、気温や降水量の持続的な変化に適応し、一過的に生じる干ばつや熱波に際しても減収率を抑えられる、といった効果が期待される。

植物において、乾燥ストレス誘導性を持つ遺伝子のプロモーターから、乾燥ストレス条件下において遺伝子を誘導するために必要なシス配列、dehydration-responsive element (DRE) が同定された。そして、このシス配列に結合する転写因子として、DEHYDRATION-RESPONSIVE ELEMENT

BINDING PROTEIN (DREB) が単離されている。シロイヌナズナには 6 種類の *DREB1* タイプの遺伝子と 8 種類の *DREB2* タイプの遺伝子が存在しており、その後の解析によって、DREB2 タイプの相同タンパク質の一つである DREB2A は、乾燥ストレスだけではなく、高温ストレス条件下においても多くの標的遺伝子の発現を誘導する重要な転写因子であることが明らかにされた。一方で、DREB2A が乾燥と高温ストレス条件下で、それぞれのストレスに特異的な標的遺伝子をどのように誘導しているのか、その詳細は明らかになっていなかった。本研究では酵母のツーハイブリッドスクリーニングにより、DREB2A の新規相互作用因子である DNA POLYMERASE II SUBUNIT B3-1 (DPB3-1) を単離し、このタンパク質が高温ストレス特異的な DREB2A の標的遺伝子誘導に関与することを明らかにした。さらに、DPB3-1 が高温ストレス条件下において、ストレス条件に特異的な転写複合体を形成する可能性を示し、その複合体を形成する候補となるタンパク質を同定した。また、*DPB3-1* を過剰発現したシロイヌナズナにおいて、高温ストレス耐性が向上する点に着目して、高温ストレス耐性を高めた形質転換イネの作出を試みた。

## 第2章 DREB2A の新規相互作用因子 DPB3-1 の単離と機能解析

この章では、酵母のツーハイブリッドスクリーニングにより単離した、DREB2A の新規相互作用因子である DPB3-1 の機能解析を行った。まず、DREB2A と DPB3-1 が酵母内、試験管内、そして植物体内で物理的に相互作用することを様々な実験手法により確かめた。そして、*DPB3-1* を過剰発現するシロイヌナズナを作出し、乾燥あるいは高温ストレスに対する耐性を評価したところ、*DPB3-1* 過剰発現体では、コントロールの植物と比較して、高温ストレス耐性が有意に向上している一方で、乾燥ストレス耐性には変化がないことが明らかになった。また、それに対応するように、*DPB3-1* 過剰発現体では、高温ストレス条件下において、高温ストレス誘導性の DREB2A 標的遺伝子の発現が向上している一方で、乾燥ストレス条件下における乾燥ストレス誘導性の遺伝子の発現には変化がないことが示された。また、*DPB3-1* のノックダウン変異体を単離して同様の実験を行ったところ、過剰発現体とは反対に、コントロール植

物と比較して高温ストレス耐性が低下しており、高温ストレス誘導性の DREB2A 標的遺伝子の発現量も低下していることが明らかになった。これらの結果から、新規相互作用因子 DPB3-1 が、DREB2A の高温ストレス特異的な正の制御因子であることが示唆された。また、*DPB3-1* 過剰発現体は高温ストレス耐性が向上しているにも関わらず、コントロール植物と同様の生長を示すことから、この遺伝子がストレス耐性作物の作出に有用なものとなり得ることが示された。さらに、マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析の結果、DPB3-1 が DREB2A だけではなく、他の因子を介した高温ストレス応答にも寄与している可能性が示唆された。

### 第3章 DREB2A および DPB3-1 と高温ストレス時に転写複合体を形成するタンパク質の単離と機能解析

DREB2A に対する、DPB3-1 の高温ストレス特異的な正の制御には、その他のタンパク質も寄与していることが第 2 章の解析により示唆された。また、DPB3-1 がタンパク質複合体を形成することが先行研究により示されていることから、高温ストレス条件下において DPB3-1 と相互作用するタンパク質の単離を試みた。先行研究により相互作用が示唆されていたタンパク質ファミリーとの網羅的な相互作用解析を行い、さらに、それらのタンパク質をコードする遺伝子について、ストレス条件下での遺伝子の発現パターンを調べた結果、高温ストレス条件下特異的に DPB3-1 と転写複合体を形成する候補として、NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT A (NF-YA) および NUCLEAR FACTOR Y, SUBUNIT B (NF-YB) ファミリータンパク質に分類される NF-YA2 と NF-YB3 を同定した。シロイヌナズナの葉肉細胞由来プロトプラスト内における転写活性化実験の結果、これらの三量体を DREB2A と共発現させると、レポーターの活性を相乗的に上昇することが明らかになった。これらの結果から、NF-YA2、NF-YB3、DPB3-1 からなる三量体が、高温ストレス特異的に DREB2A と転写複合体を形成し、その転写活性化能を正に制御していることが示唆された。

### 第4章 DPB3-1 を利用した高温ストレス耐性イネの作出

第 2 章の解析により、*DPB3-1* を過剰発現したシロイヌナズナでは、生育に変化を与えることなく、高温ストレス耐性が向上することが明らかになった。このことから、同様の高温ストレス耐性の向上が作物でも再現するかを確認するために、シロイヌナズナ *DPB3-1* を過剰発現するイネを作出した。この形質転換イネをコントロール植物と比較すると、非ストレス条件下における生育や収量には変化がないことが明らかになった。また、高温ストレス耐性試験を行ったところ、*DPB3-1* 過剰発現イネでは高温ストレス耐性が有意に向上していることが示唆された。これらの結果から、シロイヌナズナ *DPB3-1* が高温ストレス耐性を向上した作物を作出するために、有用な遺伝子となる可能性が示された。

## 第5章 総合考察、結論

今回行った解析の結果、DREB2A の新規相互作用因子として単離された *DPB3-1* を含む、NF-YA2、NF-YB3、*DPB3-1* からなる三量体が、高温ストレス特異的な DREB2A の正の制御因子であることが示唆された。また、シロイヌナズナ *DPB3-1* が環境ストレス耐性を向上した作物の作出に有用な遺伝子となる可能性が示された。今後の課題としては、乾燥ストレス特異的な DREB2A の制御機構の解明などが挙げられる。

## 発表論文

Sato, H., Mizoi, J., Tanaka, H., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Morimoto, K., Ohori, T., Kusakabe, K., Nagata, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. *Arabidopsis* Dpb3-1, a novel DREB2A interactor, specifically enhances heat stress-induced gene expression by forming a heat stress-specific transcriptional complex with NF-Y subunits. The Plant Cell (印刷中).